

PCTORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE
Bureau international

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PC

(51) Classification internationale des brevets ⁶ :A61K 39/295 // C12N 15/45, 15/35,
15/50, 15/38, 15/47

A1

(11) Numéro de publication internationale:

WO 98/0319

(43) Date de publication internationale: 29 janvier 1998 (29.01.98)

(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR97/01316

(22) Date de dépôt international: 15 juillet 1997 (15.07.97)

(30) Données relatives à la priorité:
96/09401 19 juillet 1996 (19.07.96)

FR

(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): MERIAL
[FR/FR]; 17, rue Bourgelat, F-69002 Lyon (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (US seulement): AUDONNET, Jean-
Christophe [FR/FR]; 119, rue de Créqui, F-69006 Lyon
(FR). BOUCHARDON, Annabelle [FR/FR]; 118, cours
Gambetta, F-69007 Lyon (FR). RIVIERE, Michel [FR/FR];
11, chemin du Chancelier, F-69130 Ecully (FR).(74) Mandataire: COLOMBET, Alain; Cabinet Lavoix, 2, place
d'Estienne d'Orves, F-75441 Paris Cedex 09 (FR).(81) Etats désignés: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY
CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH,
HU, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS
LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL
PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT
UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, brevet ARIPO (GH, KE,
LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY,
KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH,
DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT,
SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML,
MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée

*Avec rapport de recherche internationale.
Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des
revendications, sera republiée si de telles modifications sont
reçues.*(54) Title: POLYNUCLEOTIDE VACCINE FORMULA FOR TREATING DOG DISEASES, PARTICULARLY RESPIRATORY AND
DIGESTIVE DISEASES(54) Titre: FORMULE DE VACCIN POLYNUCLEOTIDIQUE CONTRE LES PATHOLOGIES CANINES, NOTAMMENT LES
PATHOLOGIES RESPIRATOIRES ET DIGESTIVES

(57) Abstract

A vaccine formula for treating dog diseases, including at least two vaccine valencies that each include a plasmid containing a canine pathogen valency gene capable of being expressed *in vivo* in host canine cells, said valency being a canine distemper virus valency and a canine parvovirus valency. Said plasmids include one or more genes per valency, and said genes are selected from the group which consists of HA and F for canine distemper virus and gene VP2 for canine parvovirus.

(57) Abrégé

La formule de vaccin contre des pathogènes des canidés, comprenant au moins deux valences de vaccin comprenant chacune un plasmide intégrant de manière à l'exprimer *in vivo* dans les cellules hôtes du canidé, un gène d'une valence de pathogène canin, à savoir une valence du virus de la maladie de Carré CDV et une valence du parvovirus canin CPV, les plasmides comprenant, pour chaque valence, un ou plusieurs des gènes choisis parmi le groupe consistant en HA et F pour le virus de la maladie de Carré et le gène VP2 pour le parvovirus canin.

BEST AVAILABLE COPY

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakhstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

Formule de vaccin polynucléotidique contre les pathologies canines, notamment les pathologies respiratoires et digestives.

5 La présente invention est relative à une formule de vaccin permettant la vaccination des chiens contre un grand nombre de pathologies infectieuses, notamment les pathologies respiratoires et digestives. Elle est également relative à une méthode de vaccination
10 correspondante.

La pathologie infectieuse des chiens est extrêmement diversifiée et souvent difficile à contrôler en fonction des circonstances rencontrées sur le terrain.

15 Il existe déjà un certain nombre de vaccins, notamment contre la maladie de Carré (virus CDV), la parvovirose (virus CPV), la coronavirose (virus CCV), le complexe respiratoire ou toux des chenils (virus PI2) et la rage (rhabdovirus). Ces vaccins sont, plus généralement, des vaccins vivants constitués de souches atté-
20 nuées. Cela est notamment le cas pour les vaccins de la maladie de Carré, les vaccins contre les adénoviroses canines, les vaccins contre la parvovirose et les vaccins contre le coronavirus canin.

25 Dans certains cas, des vaccins inactivés ont également été proposés, comme pour la rage et la coronavirose.

Ces différents vaccins sont vendus soit de façon séparée, c'est-à-dire sous forme de vaccins

monovalents, soit sous forme de vaccins associés, c'est-à-dire polyvalents.

5 Les associations polyvalentes développées jusqu'à présent ont toujours posé des problèmes de compatibilité entre les valences et de stabilité. Il faut en effet assurer à la fois la compatibilité entre les différentes valences du vaccin, que ce soit au plan des différents antigènes utilisés et au plan des formulations elles-mêmes, notamment dans le cas où l'on combine à la 10 fois des vaccins inactivés et des vaccins vivants. Il se pose également le problème de la conservation de tels vaccins combinés et aussi de leur innocuité notamment en présence d'adjuvant. Ces vaccins sont en général assez coûteux.

15 Le degré de protection, et la durée de cette protection, peuvent en outre être très variables et sont sensibles aussi aux circonstances de terrain. Cela est particulièrement vrai pour la vaccination des chiots, chez lesquels les anticorps d'origine maternelle s'opposent à l'immunisation par les vaccins inactivés et, même, 20 par des vaccins vivants.

Il peut donc être souhaitable de perfectionner la vaccination des canidés, et notamment des chiens, tout en gardant en mémoire les contraintes économiques, 25 qui s'opposent à l'utilisation de vaccins coûteux ou de mises en oeuvre complexes.

Des essais de vaccination contre la maladie de Carré par des préparations purifiées d'antigènes de fusion F et d'équivalents de l'hémagglutinine H en 30 adjuvant complet de Freund ont suggéré que l'antigène F

pourrait constituer un immunogène d'intérêt pour la protection contre le virus CDV (E. Norrby et al., J. of Virol. Mai 1986: 536-541), pour un vaccin de sous-unités.

Un autre article (P. de Vries et al., J. gen. Virol. 1988, 69: 2071-2083) suggère, par contre, que les protéines F et HA de CDV pourraient être intéressantes dans une vaccination selon la technique des complexes immunostimulants (ISCOMS).

Des souris immunisées par un recombinant vaccine exprimant le gène de la protéine F de CDV ont été protégés contre l'épreuve par ce virus.

Il s'agit là cependant de résultats de laboratoire, difficiles à interpréter, surtout dans des conditions de terrain.

Concernant les parvoviroses, des essais de vaccins de sous-unité contenant la protéine majeure de la capside VP2 du virus CPV obtenu par recombinaison génétique dans le baculovirus, ont permis de montrer une protection des chiens ainsi immunisés contre une épreuve par le virus CPV.

Concernant l'herpèsvirus canin CHV, des études ont été effectuées sur l'utilisation des glycoprotéines en tant que composants de vaccins de sous-unité. Ces études ont montré l'induction de réponses croisées avec d'autres herpèsvirus tels que FHV mais ne tirent pas de conclusion sur les possibilités de réaliser un vaccin protecteur.

Pour la maladie de Lyme, OspA et OspB associés induisent une protection chez la souris et le chien et OspA seul chez la souris, le hamster et le

chien.

Les demandes de brevet WO-A-90 11092, WO-A-93 19183, WO-A-94 21797 et WO-A-95 20660 ont fait usage de la technique récemment développée des vaccins polynucléotidiques. On sait que ces vaccins utilisent un plasmide
5 pate à exprimer dans les cellules de l'hôte l'antigène inséré sur le plasmide. Toutes les voies d'administration ont été proposées (intrapéritonéale, intraveineuse, intramusculaire, transcutanée, intradermique, mucosale,
10 etc.). Différents moyens de vaccination peuvent également être utilisés, tels que ADN déposé à la surface de particules d'or et projeté de façon à pénétrer dans la peau de l'animal (Tang et al., Nature 356, 152-154, 1992) et les injecteurs par jet liquide permettant de transfecter
15 à la fois dans la peau, le muscle, les tissus graisseux et les tissus mammaires (Furth et al., Analytical Biochemistry, 205, 365-368, 1992).

Les vaccins polynucléotidiques peuvent utiliser aussi bien des ADN nus que des ADN formulés par
20 exemple au sein de liposomes ou de lipides cationiques.

L'art antérieur ne donne par contre aucun résultat de protection chez le chien par la méthode de la vaccination polynucléotidique contre ces maladies. Beaucoup moins de choses sont encore connues sur le
25 coronavirus canin CCV et sur les agents responsables du complexe respiratoire.

Concernant la rage, il a été démontré une protection des souris contre épreuve virulente après un traitement par vaccin polynucléotidique exprimant le gène
30 de la protéine G sous le contrôle du promoteur précoce

du virus SV40 (Xiang et al., Virology 199, 1994, : 132-140), un résultat similaire étant atteint en utilisant le promoteur IE de CMV.

5 L'invention se propose de fournir une formule de vaccin multivalent permettant d'assurer une vaccination des chiens contre un certain nombre d'agents pathogènes.

10 Un autre objectif de l'invention est de fournir une telle formule de vaccin associant différentes valences tout en présentant tous les critères requis de compatibilité et de stabilité des valences entre elles.

Un autre objectif de l'invention est de fournir une telle formule de vaccin permettant d'associer différentes valences dans un même véhicule.

15 Un autre objectif de l'invention est de fournir une telle formule de vaccin qui soit de mise en oeuvre aisée et peu coûteuse.

20 Un autre objectif, encore, de l'invention est de fournir une méthode de vaccination qui permette d'accroître considérablement l'efficacité du vaccin selon l'invention ou de diminuer fortement la quantité de vaccin nécessaire, et ayant une bonne innocuité.

25 La présente invention a donc pour objet une formule de vaccin contre des pathogènes des canidés, comprenant au moins deux valences de vaccin comprenant chacune un plasmide intégrant de manière à l'exprimer in vivo dans les cellules du canidé, un gène d'une valence de pathogène canin, à savoir une valence du virus de la maladie de Carré CDV et une valence du parvovirus canin
30 CPV, les plasmides comprenant, pour chaque valence, un

ou plusieurs des gènes choisis parmi le groupe consistant en HA et F pour le virus de la maladie de Carré et le gène VP2 pour le parvovirus canin.

De préférence, pour la valence de la maladie de Carré, le ou les plasmides comportent les gènes HA et F, soit insérés dans un même plasmide, soit insérés dans des plasmides différents.

Le vaccin multivalent selon l'invention peut également comprendre une valence du coronavirus canin CCV, avec un ou des plasmides comprenant un ou plusieurs des gènes choisis parmi le groupe des gènes S et M et de préférence le gène S ou les gènes S et M. Là également, les gènes peuvent être insérés dans des plasmides différents ou regroupés dans un même plasmide dans un cadre permettant leur expression. Le vaccin bi ou trivalent précité, selon l'invention, peut également comprendre, en outre, une valence efficace pour la prévention du complexe respiratoire, à savoir une valence de PI2 comprenant un ou des plasmides qui comprennent l'un au moins des gènes HA et F. De préférence, on prévoit d'utiliser à la fois les deux gènes HA et F.

D'autres valences intéressantes dans le cas de la présente invention peuvent donc être associées aux vaccins selon l'invention, à savoir une ou plusieurs des valences choisies dans le groupe formé par l'herpès-virose CHV, la maladie de Lyme et la rage, les plasmides comprenant, pour chaque valence, un ou plusieurs des gènes choisis dans le groupe composé par les gènes gB, gD pour le virus CHV, les gènes OspA, OspB, et p100, pour B. Burgdorferi (maladie de Lyme), et le gène G pour la

rage.

De préférence, pour l'herpès-virose, on associe soit dans deux plasmides séparés, soit dans un seul plasmide, les deux gènes gB et gD. Pour la maladie de Lyme, on préfère le gène OspA.

De préférence, le vaccin selon l'invention comprenant les valences maladie de Carré et parvovirose comprendra, comme autre valence, la valence coronavirose ou, moins préférentiellement, la valence complexe respiratoire, ou ces deux valences, étant entendu que toute combinaison comprenant, une, plusieurs ou l'ensemble des valences coronavirose, complexe respiratoire, herpès-virose, maladie de Lyme et rage peut être associée aux deux valences maladie de Carré et parvovirose.

Par valence, dans la présente invention, on entend au moins un antigène assurant une protection contre le virus du pathogène considéré, la valence pouvant contenir, à titre de sous-valence, un ou plusieurs gènes naturels ou modifiés d'une ou plusieurs souches du pathogène considéré.

Par gène d'agent pathogène, on entend non seulement le gène complet, mais aussi les séquences nucléotidiques différentes, y compris fragments, conservant la capacité à induire une réponse protectrice. La notion du gène recouvre les séquences nucléotidiques équivalentes à celles décrites précisément dans les exemples, c'est-à-dire les séquences différentes mais codant pour la même protéine. Elle recouvre aussi les séquences nucléotidiques d'autres souches du pathogène considéré, assurant une protection croisée ou une

protection spécifique de souche ou de groupe de souche. Elle recouvre encore les séquences nucléotidiques qui ont été modifiées pour faciliter l'expression in vivo par l'animal hôte mais codant pour la même protéine.

5 Les différentes valences sont contenues dans la formulation vaccinale selon l'invention en quantité thérapeutiquement efficace.

De préférence la formule de vaccin selon l'invention pourra se présenter dans un véhicule convenable pour l'administration de préférence par voie
10 intramusculaire, sous un volume de dose compris entre 0,1 et 5 ml, de préférence entre 0,5 et 2 ml.

La dose sera généralement comprise entre 10 ng et 1 mg, de préférence 100 ng et 500 µg, et préféren-
15 tiellement entre 1 µg et 250 µg par type de plasmide.

On utilisera de préférence des plamides nus simplement placés dans le véhicule de vaccination qui sera en général de l'eau physiologique (NaCl 0,9 %), eau
ultrapure, tampon TE, etc. On peut bien entendu utiliser
20 toutes les formes de vaccins polynucléotidiques décrites dans l'art antérieur.

Chaque plasmide comprend un promoteur apte à assurer l'expression du gène inséré sous sa dépendance dans les cellules hôtes. Il s'agira en général d'un
25 promoteur eucaryote fort et en particulier d'un promoteur précoce du cytomégalovirus CMV-IE, d'origine humaine ou murine, ou encore éventuellement d'une autre origine telle que rat, cochon, cobaye.

De manière plus générale, le promoteur pourra
30 être soit d'origine virale, soit d'origine cellulaire.

Comme promoteur viral autre que CMV-IE, on peut citer le promoteur précoce ou tardif du virus SV 40 ou le promoteur LTR du virus du Sarcome de Rous. Il peut aussi s'agir d'un promoteur du virus dont provient le gène, par exemple le promoteur propre au gène.

Comme promoteur cellulaire, on peut citer le promoteur d'un gène du cytosquelette, tel par exemple le promoteur de la desmine (Bolmont et al., Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology, 1990, 22, 117-122 ; et ZHENLIN et al., Gene, 1989, 78, 243-254), ou encore le promoteur de l'actine.

Lorsque plusieurs gènes sont présents dans le même plasmide, ceux-ci peuvent être présentés dans la même unité de transcription ou dans deux unités différentes.

La combinaison des différentes valences du vaccin selon l'invention peut être effectuée, de préférence, par mélange de plasmides polynucléotidiques exprimant le ou les antigène(s) de chaque valence , mais on peut également prévoir de faire exprimer des antigènes de plusieurs valences par un même plasmide.

La présente invention a également pour objet une méthode de vaccination des chiens comprenant l'administration d'une dose efficace d'une formule de vaccin telle que décrite plus haut. Cette méthode de vaccination comprend l'administration d'une ou de plusieurs doses de la formule de vaccin, ces doses pouvant être administrées successivement dans un court laps de temps et/ou successivement à des moments éloignés l'un de l'autre.

Les formules de vaccin selon l'invention

pourront être administrées dans le cadre de cette méthode de vaccination par les différentes voies d'administration proposées dans l'art antérieur dans le cas de la vaccination polynucléotidique et au moyen des techniques d'administration connues, la voie préférée étant la voie intramusculaire.

L'efficacité de la présentation des antigènes au système immunitaire varie en fonction des tissus. En particulier, les muqueuses de l'arbre respiratoire servent de barrière à l'entrée des pathogènes et sont associées à des tissus lymphoïdes qui supportent une immunité locale. L'administration d'un vaccin par contact avec les muqueuses, en particulier muqueuses buccale, pharyngée et région bronchique présente un intérêt certain pour la vaccination contre les pathologies respiratoire et digestive.

En conséquence, les voies d'administration mucosales font partie d'un mode d'administration pour l'invention, utilisant notamment la nébulisation ou spray ou l'eau de boisson. Les formules de vaccin et méthodes de vaccination selon l'invention pourront être appliquées dans ce cadre.

L'invention a encore pour objet des formules de vaccin monovalent comprenant un ou plusieurs plasmides codant pour un ou plusieurs gènes de l'un des virus ci-dessus, les gènes étant ceux décrits plus haut. En dehors de leur caractère monovalent, ces formules peuvent reprendre les caractéristiques énoncées plus haut en ce qui concerne le choix des gènes, leurs combinaisons, la composition des plasmides, les volumes de dose, les

doses, etc.

Les formules de vaccin monovalent peuvent être utilisées (i) pour la préparation d'une formule de vaccin polyvalent tel que décrit plus haut (ii) à titre individuel contre la pathologie propre, (iii) associées à un vaccin d'un autre type (entier vivant ou inactivé, recombinant, sous-unité) contre une autre pathologie, ou (iv) comme rappel d'un vaccin comme décrit ci-après.

La présente invention a en effet encore pour objet l'utilisation d'un ou de plusieurs plasmides selon l'invention pour la fabrication d'un vaccin canin destiné à vacciner des animaux primo-vaccinés au moyen d'un premier vaccin classique (monovalent ou multi-valent), du type de ceux de l'art antérieur, choisi notamment dans le groupe consistant en vaccin entier vivant, vaccin entier inactivé, vaccin de sous-unité, vaccin recombinant, ce premier vaccin présentant (c'est-à-dire contenant ou pouvant exprimer) le ou les antigène(s) codé(s) par le ou les plasmide(s) ou antigène(s) assurant une protection croisée.

De manière remarquable, le vaccin polynucléotidique a un effet de rappel puissant se traduisant par une amplification de la réponse immunitaire et l'instauration d'une immunité de longue durée.

De manière générale, les vaccins de primo-vaccination pourront être choisis parmi les vaccins commerciaux disponibles auprès des différents producteurs de vaccins vétérinaires.

L'invention a encore pour objet la méthode de vaccination consistant à faire une primo-vaccination

telle que décrite ci-dessus et un rappel avec une formule de vaccin selon l'invention.

Dans une forme de mise en oeuvre préférée du procédé selon l'invention, on administre dans un premier
5 temps, à l'animal, une dose efficace du vaccin de type classique, notamment inactivé, vivant, atténué ou recombinant, ou encore un vaccin de sous-unité de façon à assurer une primo-vaccination, et, après un délai de préférence de 2 à 6 semaines, on assure l'administration
10 du vaccin polyvalent ou monovalent selon l'invention.

L'invention a aussi pour objet un kit de vaccination regroupant un vaccin de primo-vaccination tel que décrit ci-dessus et une formule de vaccin selon l'invention pour le rappel. Elle a aussi trait à une
15 formule de vaccin selon l'invention accompagnée d'une notice indiquant l'usage de cette formule comme rappel d'une primo-vaccination telle que décrite ci-avant.

L'invention concerne aussi la méthode de préparation des formules de vaccin, à savoir la préparation des valences et leurs mélanges, telle qu'elle ressort
20 de cette description.

L'invention va être maintenant décrite plus en détails à l'aide de modes de réalisation de l'invention pris en référence aux dessins annexés.

25

30

Liste des figures

- Figure N° 1 : Plasmide pVR1012
Figure N° 2 : Plasmide pAB044
Figure N° 3 : Plasmide pAB036
5 Figure N° 4 : Plasmide pAB024
Figure N° 5 : Plasmide pAB021
Figure N° 6 : Plasmide pAB022
Figure N° 7 : Plasmide pAB037
Figure N° 8 : Plasmide pAB038
10 Figure N° 9 : Plasmide pAB017
Figure N° 10 : Plasmide pAB041

Liste des séquences SEQ ID N°

- SEQ ID N° 1 : Oligonucléotide AB017
15 SEQ ID N° 2 : Oligonucléotide AB018
SEQ ID N° 3 : Oligonucléotide AB085
SEQ ID N° 4 : Oligonucléotide AB086
SEQ ID N° 5 : Oligonucléotide AB053
SEQ ID N° 6 : Oligonucléotide AB054
20 SEQ ID N° 7 : Oligonucléotide AB045
SEQ ID N° 8 : Oligonucléotide AB048
SEQ ID N° 9 : Oligonucléotide AB049
SEQ ID N° 10 : Oligonucléotide AB050
SEQ ID N° 11 : Oligonucléotide AB087
25 SEQ ID N° 12 : Oligonucléotide AB088
SEQ ID N° 13 : Oligonucléotide AB089
SEQ ID N° 14 : Oligonucléotide AB090
SEQ ID N° 15 : Oligonucléotide AB038
SEQ ID N° 16 : Oligonucléotide AB039
30 SEQ ID N° 17 : Oligonucléotide AB011
SEQ ID N° 18 : Oligonucléotide AB012

EXEMPLES

Exemple 1 : Culture des virus

Les virus sont cultivés sur le système cellulaire approprié jusqu'à obtention d'un
5 effet cytopathique. Les systèmes cellulaires à utiliser pour chaque virus sont
bien connus de l'homme du métier. Brièvement, des cellules sensibles au virus
utilisé, cultivées en milieu minimum essentiel de Eagle (milieu "MEM) ou un
autre milieu approprié, sont inoculées avec la souche virale étudiée en utilisant
10 une multiplicité d'infection de 1. Les cellules infectées sont alors incubées à
37°C pendant le temps nécessaire à l'apparition d'un effet cytopathique
complet (en moyenne 36 heures).

Exemple 2 : Culture des bactéries:

Les souches de *Borrelia burgdorferi* sont cultivées dans les milieux appropriés
15 et selon les conditions bien connues de l'homme de l'art. Ces conditions et
milieux sont en particulier décrits par A. Barbour (J. Biol. Med. 1984. 57. 71-
75). L'extraction de l'ADN bactérien a été réalisé selon les conditions décrites
par W. Simpson et al. (Infect. Immun. 1990. 58. 847-853). Les techniques
usuelles décrites par J. Sambrook et al. (*Molecular Cloning: A Laboratory*
20 *Manual*. 2nd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor. New
York. 1989) peuvent également être utilisées.

Exemple 3 : Extraction des ADNs génomiques viraux:

Après culture, le surnageant et les cellules lysées sont récoltées et la totalité de
25 la suspension virale est centrifugée à 1000 g pendant 10 minutes à + 4°C
pour éliminer les débris cellulaires. Les particules virales sont alors récoltées par
ultracentrifugation à 400000 g pendant 1 heure à + 4°C. Le culot est repris
dans un volume minimum de tampon (Tris 10 mM, EDTA 1 mM). Cette
suspension virale concentrée est traitée par la protéinase K (100 µg/ml final) en
30 présence de sodium dodecyl sulfate (SDS) (0,5% final) pendant 2 heures à
37°C. L'ADN viral est ensuite extrait avec un mélange de phénol/chloroforme,
puis précipité avec 2 volumes d'éthanol absolu. Après une nuit à - 20°C, l'ADN

est centrifugé à 10000 g pendant 15 minutes à + 4°C. Le culot d'ADN est séché, puis repris dans un volume minimum d'eau ultrapure stérile. Il peut alors être digéré par des enzymes de restriction.

5 **Exemple 4 : Isolement des ARNs génomiques viraux**

Les virus à ARN ont été purifiés selon les techniques bien connues de l'homme du métier. L'ARN viral génomique de chaque virus a été ensuite isolé en utilisant la technique d'extraction "thiocyanate de guanidium/phénol-chloroforme" décrite par P. Chomczynski et N. Sacchi (Anal. Biochem. 1987, 10 162. 156-159).

Exemple 5 : Techniques de biologie moléculaire

Toutes les constructions de plasmides ont été réalisées en utilisant les techniques standards de biologie moléculaire décrites par Sambrook J. *et al.* 15 (*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor. New York. 1989). Tous les fragments de restriction utilisés pour la présente invention ont été isolés en utilisant le kit "GeneClean" (BIO101 Inc. La Jolla, CA).

20 **Exemple 6 : Technique de RT-PCR**

Des oligonucléotides spécifiques (comportant à leurs extrémités 5' des sites de restriction pour faciliter le clonage des fragments amplifiés) ont été synthétisés de telle façon qu'ils couvrent entièrement les régions codantes des gènes devant être amplifiés (voir exemples spécifiques). La réaction de transcription 25 inverse (RT) et l'amplification en chaîne par polymérase (PCR) ont été effectuées selon les techniques standards (Sambrook J. *et al.* 1989). Chaque réaction de RT-PCR a été faite avec un couple d'amplimers spécifiques et en prenant comme matrice l'ARN génomique viral extrait. L'ADN complémentaire amplifié a été extrait au phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25:24:1) avant 30 d'être digéré par les enzymes de restriction.

Exemple 7 : plasmide pVR1012

Le plasmide pVR1012 (Figure N° 1) a été obtenu auprès de Vical Inc. San Diego, CA, USA. Sa construction a été décrite dans J. Hartikka *et al.* (Human Gene Therapy. 1996. 7. 1205-1217).

5

Exemple 8 : Construction du plasmide pAB044 (gène CDV HA)

Une réaction de RT-PCR selon la technique de l'exemple 6 a été réalisée avec l'ARN génomique du virus de la maladie de Carré (CDV) (Souche Onderstepoort) (M. Sidhu *et al.* Virology. 1993. 193. 66-72), préparé selon la technique de

10 l'exemple 4, et avec les oligonucléotides suivants:

AB017 (35 mer) (SEQ ID N° 1)

5'AAAAGTGCAGAATGCTCCCCTACCAAGACAAGGTG 3'

AB018 (37 mer) (SEQ ID N° 2)

5'CGCGGATCCTTAACGGTTACATGAGAATCTTATACGG 3'

15 pour isoler le gène codant pour la glycoprotéine HA du CDV sous la forme d'un fragment PstI-BamHI. Après purification, le produit de RT-PCR de 1835 pb a été digéré par PstI et BamHI pour isoler un fragment PstI-BamHI de 1817 pb. Ce fragment a été ligaturé avec le vecteur pVR1012 (exemple 7), préalablement digéré avec PstI et BamHI, pour donner le plasmide pAB044 (6676 pb) (Figure

20 N° 2).

Exemple 9 : Construction du plasmide pAB036 (gène CDV F)

Une réaction de RT-PCR selon la technique de l'exemple 6 a été réalisée avec l'ARN génomique du virus de la maladie de Carré (CDV) (Souche Onderstepoort)

25 (R. Driellen N° d'accès séquence sur Genbank = X65509), préparé selon la technique de l'exemple 4, et avec les oligonucléotides suivants:

AB085 (40 mer) (SEQ ID N° 3)

5'ATAAGAAGCGGCCGCACATGCACAAGGGAATCCCCAAAAG 3'

AB086 (32 mer) (SEQ ID N° 4)

30 5'CGCGGATCCACTTCAGTGTGATCTCACATAGG 3'

pour isoler le gène codant pour la glycoprotéine F du CDV sous la forme d'un fragment NotI-BamHI. Après purification, le produit de RT-PCR de 2018 pb a

été digéré par *NotI* et *BamHI* pour isoler un fragment *NotI*-*BamHI* de 2000 pb. Ce fragment a été ligaturé avec le vecteur pVR1012 (exemple 7), préalablement digéré avec *NotI* et *BamHI*, pour donner le plasmide pAB036 (6893 pb) (Figure N° 3).

5

Exemple 10 : Construction du plasmide pAB024 (gène Parvovirus canin VP2)

Une réaction de PCR a été réalisée avec l'ADN génomique du parvovirus canin (CPV) (Souche CPV-b) (C. Parrish N° d'accès séquence sur Genbank = M19296), préparé selon la technique de l'exemple 3, et avec les

10 oligonucléotides suivants:

AB053 (33 mer) (SEQ ID N° 5)

5'ACGCGTCGACATGAGTGATGGAGCAGTTCAACC 3'

AB054 (33 mer) (SEQ ID N° 6)

5'CGCGGATCCTTAATATAATTTTCTAGGTGCTAG 3'

15 pour isoler le gène codant pour la protéine de capsid VP2 (CPV VP2) sous la forme d'un fragment *Sall*-*BamHI*. Après purification, le produit de PCR de 1773 pb a été digéré par *Sall* et *BamHI* pour isoler un fragment *Sall*-*BamHI* de 1760 pb. Ce fragment a été ligaturé avec le vecteur pVR1012 (exemple 7), préalablement digéré avec *Sall* et *BamHI*, pour donner le plasmide pAB024

20 (6629 pb) (Figure N° 4).

Exemple 11 : Construction du plasmide pAB021 (gène CCV S)

Une réaction de RT-PCR selon la technique de l'exemple 6 a été réalisée avec l'ARN génomique du coronavirus canin (CCV) (B. Horsburgh *et al.* J. Gen. Virol. 1992. 73. 2849-2862), préparé selon la technique de l'exemple 4, et avec les

25 oligonucléotides suivants:

AB045 (32 mer) (SEQ ID N° 7)

5'ACGCGTCGACATGATTGTGCTTACATTGTGCC 3'

AB048 (35 mer) (SEQ ID N° 8)

30 5'CGCGGATCCTCAGTGAACATGAACTTTTCAATAG 3'

pour amplifier un fragment de 4374 pb contenant le gène codant pour la glycoprotéine S du CCV sous la forme d'un fragment *Sall*-*BamHI*. Après

purification, le produit de RT-PCR a été digéré par *Sa*I et *Bam*HI pour donner un fragment *Sa*I-*Bam*HI de 4361 pb.

Ce fragment a été ligaturé avec le vecteur pVR1012 (exemple 7), préalablement digéré avec *Sa*I et *Bam*HI, pour donner le plasmide pAB021 (9230 pb) (Figure 5 N° 5).

Exemple 12 : Construction du plasmide pAB022 (gène CCV M)

Une réaction de RT-PCR selon la technique de l'exemple 6 a été réalisée avec l'ARN génomique du coronavirus canin (CCV) (B. Horsburgh *et al.* J. Gen. Virol. 1992. 73. 2849-2862), préparé selon la technique de l'exemple 4, et avec les oligonucléotides suivants:

AB049 (34 mer) (SEQ ID N° 9)

5'AAAACTGCAGAAATGAAGAAAATTTTGTTTTTAC 3'

AB050 (33 mer) (SEQ ID N° 10)

15 5'CGCGGATCCTTATACCATATGTAATAATTTTTC 3'

pour isoler le gène codant pour la glycoprotéine M (CCV M) sous la forme d'un fragment *Pst*I-*Bam*HI. Après purification, le produit de RT-PCR de 809 pb a été digéré par *Pst*I et *Bam*HI pour isoler un fragment *Pst*I-*Bam*HI de 792 pb. Ce fragment a été ligaturé avec le vecteur pVR1012 (exemple 7), préalablement digéré avec *Pst*I et *Bam*HI, pour donner le plasmide pAB022 (5651 pb) (Figure 20 N° 6).

Exemple 13 : Construction du plasmide pAB037 (gène CHV gB)

Une réaction de PCR a été réalisée avec l'ADN génomique de l'herpèsvirus canin (CHV) (Souche Carmichael) (K. Limbach *et al.* J. Gen. Virol. 1994. 75. 2029-2039), préparé selon la technique de l'exemple 3, et avec les oligonucléotides suivants:

AB087 (34 mer) (SEQ ID N° 11)

5'AAAACTGCAGAAAGTATGTTTTTCATTGTATCTATA 3'

30 AB088 (34 mer) (SEQ ID N° 12)

5'CTAGTCTAGATTATTAACTTTACTTTTCATTTTC 3'

pour isoler le gène codant pour la glycoprotéine gB du virus CHV sous la forme

d'un fragment *Pst*I-*Xba*I. Après purification, le produit de PCR de 2667 pb a été digéré par *Pst*I et *Xba*I pour isoler un fragment *Pst*I-*Xba*I de 2648 pb. Ce fragment a été ligaturé avec le vecteur pVR1012 (exemple 7), préalablement digéré avec *Pst*I et *Xba*I, pour donner le plasmide pAB037 (7523 pb) (Figure N° 5 7).

Exemple 14 : Construction du plasmide pAB038 (gène CHV gD)

Une réaction de PCR a été réalisée avec l'ADN génomique de l'herpèsvirus canin (CHV) (Souche Carmichael) (K. Limbach *et al.* J. Gen. Virol. 1994. 75. 10 2029-2039), préparé selon la technique de l'exemple 3, et avec les oligonucléotides suivants:

AB089 (34 mer) (SEQ ID N° 13)
 5'AAAACCTGCAGAAAATGATTAACTTCTATTTATC 3'
 AB090 (35 mer) (SEQ ID N° 14)
 15 5'ATAAGAATGCGGCCGCAAAGGCTAAACATTTGTTG 3'

pour isoler le gène codant pour la glycoprotéine gD du virus CHV sous la forme d'un fragment *Pst*I-*Not*I. Après purification, le produit de PCR de 1072 pb a été digéré par *Pst*I et *Not*I pour isoler un fragment *Pst*I-*Not*I de 1049 pb. Ce fragment a été ligaturé avec le vecteur pVR1012 (exemple 7), préalablement
 20 digéré avec *Pst*I et *Not*I, pour donner le plasmide pAB038 (5930 pb) (Figure N° 8).

Exemple 15: Construction du plasmide pAB017 (gène *Borrelia burgdorferi* ospA)

Une réaction de PCR a été réalisée avec l'ADN génomique de *Borrelia burgdorferi* (Souche B31) (S. Bergstrom *et al.* Mol. Microbiol. 1989. 3. 479-
 25 486.), préparé selon la technique de l'exemple 2, et avec les oligonucléotides suivants:

AB038 (37 mer) (SEQ ID N° 15)
 5'ACGCGTCTGACTATGAAAAAATATTTATTGGGAATAGG 3'
 30 AB039 (34 mer) (SEQ ID N° 16)
 5'CGCGGATCCCTTATTTTAAAGCGTTTTTAATTTC 3'

pour isoler le gène codant pour la protéine de membrane OspA sous la forme

d'un fragment *Sall*-*Bam*HI. Après purification, le produit de PCR de 842 pb a été digéré par *Sa*I et *Bam*HI pour isoler un fragment *Sall*-*Bam*HI de 829 pb. Ce fragment a été ligaturé avec le vecteur pVR1012 (exemple 7), préalablement digéré avec *Sa*I et *Bam*HI, pour donner le plasmide pAB017 (5698 pb) (Figure N° 9).

Exemple 16 : Construction du plasmide pAB041 (gène G du virus de la rage)

Une réaction RT-PCR selon la technique de l'exemple 6 a été réalisée avec l'ARN génomique du virus de la rage (Souche ERA) (A. Anilionis *et al.* Nature. 1981. 294. 275-278), préparé selon la technique de l'exemple 4, et avec les oligonucléotides suivants:

AB011 (33 mer) (SEQ ID N° 17)

5'AAAACTGCAGAGATGGTTCCTCAGGCTCTCCTG 3'

AB012 (34 mer) (SEQ ID N° 18)

15 5'CGCGGATCCTCACAGTCTGGTCTCACCCCCACTC 3'

pour amplifier un fragment de 1589 pb contenant le gène codant pour la glycoprotéine G du virus de la rage. Après purification, le produit de RT-PCR a été digéré par *Pst*I et *Bam*HI pour donner un fragment *Pst*I-*Bam*HI de 1578 pb. Ce fragment a été ligaturé avec le vecteur pVR1012 exemple 7), préalablement digéré avec *Pst*I et *Bam*HI, pour donner le plasmide pAB041 (6437 pb) (Figure N° 10).

Exemple 17 : Production et purification des plasmides

Pour la préparation des plasmides destinés à la vaccination des animaux, on peut utiliser toute technique permettant d'obtenir une suspension de plasmides purifiés majoritairement sous forme superenroulée. Ces techniques sont bien connues de l'homme de l'art. On peut citer en particulier la technique de lyse alcaline suivie de deux ultracentrifugations successives sur gradient de chlorure de césium en présence de bromure d'éthidium telle que décrite dans J. Sambrook *et al.* (*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor. New York. 1989). On peut se référer également aux demandes de brevet PCT WO 95/21250 et PCT WO

96/02658 qui décrivent des méthodes pour produire à l'échelle industrielle des plasmides utilisables pour la vaccination. Pour les besoins de la fabrication des vaccins (voir exemple 17), les plasmides purifiés sont resuspendus de manière à obtenir des solutions à haute concentration (> 2 mg/ml) compatibles avec le stockage. Pour ce faire, les plasmides sont resuspendus soit en eau ultrapure, soit en tampon TE (Tris-HCl 10 mM; EDTA 1 mM, pH 8,0).

Exemple 18 : Fabrication des vaccins associés

- Les divers plasmides nécessaires à la fabrication d'un vaccin associé sont (17) mélangés à partir de leurs solutions concentrées (exemple 16). Les mélanges sont réalisés de telle manière que la concentration finale de chaque plasmide corresponde à la dose efficace de chaque plasmide. Les solutions utilisables pour ajuster la concentration finale du vaccin peuvent être soit une solution NaCl à 0,9 % , soit du tampon PBS.
- 15 Des formulations particulières telles que les liposomes, les lipides cationiques, peuvent aussi être mises en oeuvre pour la fabrication des vaccins.

Exemple 19 : Vaccination des chiens

- Les chiens sont vaccinés avec des doses de 10 μ g, 50 μ g ou 250 μ g par plasmide.
- 20 Les injections peuvent être réalisées à l'aiguille par voie intramusculaire. Dans ce cas, les doses vaccinales sont administrées sous des volumes de 1 ou 2 ml. Les injections peuvent être réalisées à l'aiguille par voie intradermique. Dans ce cas, les doses vaccinales sont administrées sous un volume total de 1 ml
- 25 administré en 10 points de 0,1 ml ou en 20 points de 0,05 ml. Les injections intradermiques sont réalisées après avoir rasé la peau (flanc thoracique en général) ou bien au niveau d'une région anatomique relativement glabre, par exemple la face interne de la cuisse. On peut également utiliser un appareil d'injection à jet liquide pour les injections intradermiques.

REVENDICATIONS

1. Formule de vaccin contre des pathogènes
5 des canidés, comprenant au moins deux valences de vaccin
comprenant chacune un plasmide intégrant de manière à
l'exprimer in vivo dans les cellules hôtes du canidé, un
gène d'une valence de pathogène canin, à savoir une
valence du virus de la maladie de Carré CDV et une
10 valence du parvovirus canin CPV, les plasmides compre-
nant, pour chaque valence, un ou plusieurs des gènes
choisis parmi le groupe consistant en HA et F pour le
virus de la maladie de Carré et le gène VP2 pour le
parvovirus canin.
- 15 2. Formule de vaccin selon la revendication
1, caractérisée en ce que pour la valence de la maladie
de Carré, le ou les plasmides comportent les gènes HA et
F, soit inséré dans un même plasmide, soit insérés dans
des plasmides différents.
- 20 3. Formule de vaccin selon la revendication
1, caractérisée en ce qu'elle comprend une valence du
coronavirus canin CCV, avec un ou des plasmides compre-
nant un ou plusieurs des gènes choisis parmi le groupe
des gènes S et M.
- 25 4. Formule de vaccin selon la revendication
3, caractérisée en ce qu'elle comprend le gène S ou les
gènes S et M.
- 30 5. Formule de vaccin selon l'une quelconque
des revendications 1 à 4, caractérisée en ce qu'elle
comprend, en outre, une valence efficace pour la préven-

tion du complexe respiratoire, à savoir une valence de PI2 comprenant un ou des plasmides qui comprennent l'un au moins des gènes HA et F.

5 6. Formule de vaccin selon la revendication 5, caractérisée en ce qu'elle comprend les deux gènes HA et F de la valence complexe respiratoire.

7. Formule de vaccin selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisée en ce qu'elle comprend une ou plusieurs des valences choisies dans le 10 groupe formé par l'herpès-virose CHV, la maladie de Lyme et la rage, les plasmides comprenant, pour chaque valence, un ou plusieurs des gènes choisis dans le groupe composé par les gènes gB, gD pour le virus CHV, les gènes OspA, OspB, et p100, pour B. Burgdorferi, et le gène G 15 pour la rage.

8. Formule de vaccin selon la revendication 7, caractérisée en ce qu'elle comprend l'herpès-virose, on associe soit dans deux plasmides séparés, soit dans un seul plasmide, les deux gènes gB et gD.

20 9. Formule de vaccin selon la revendication 8, caractérisée en ce qu'elle comprend pour la maladie de Lyme le gène OspA.

10. Formule de vaccin selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, caractérisée en ce qu'il 25 comprend de 10 ng à 1 mg, de préférence de 100 ng à 500 µg plus préférentiellement entre 1 µg et 250 µg de chaque plasmide.

11. Utilisation d'un ou de plusieurs plasmi- 30 des tels que décrits dans l'une quelconque des revendications 1 à 10, pour la fabrication d'un vaccin canin

destiné à vacciner les animaux primo-vaccinés au moyen d'un premier vaccin choisi dans le groupe consistant en vaccin entier vivant, vaccin entier inactivé, vaccin de sous-unité, vaccin recombinant, ce premier vaccin
5 présentant le ou les antigène(s) codé(s) par le ou les plasmide(s) ou antigène(s) assurant une protection croisée.

12. Kit de vaccination regroupant une formule de vaccin selon l'une quelconque des revendications 1 à
10 10 et un vaccin canin choisi dans le groupe consistant en vaccin entier vivant, vaccin entier inactivé, vaccin de sous-unité, vaccin recombinant, ce premier vaccin présentant l'antigène codé par le vaccin polynucléotidique ou un antigène assurant une protection croisée,
15 pour une administration de ce dernier en primo-vaccination et pour un rappel avec la formule de vaccin.

13. Formule de vaccin selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, accompagnée d'une notice indiquant que cette formule est utilisable en rappel d'un
20 premier vaccin canin choisi dans le groupe consistant en vaccin entier vivant, vaccin entier inactivé, vaccin de sous-unité, vaccin recombinant, ce premier vaccin présentant l'antigène codé par le vaccin polynucléotidique ou un antigène assurant une protection croisée.

25

30

1 / 10

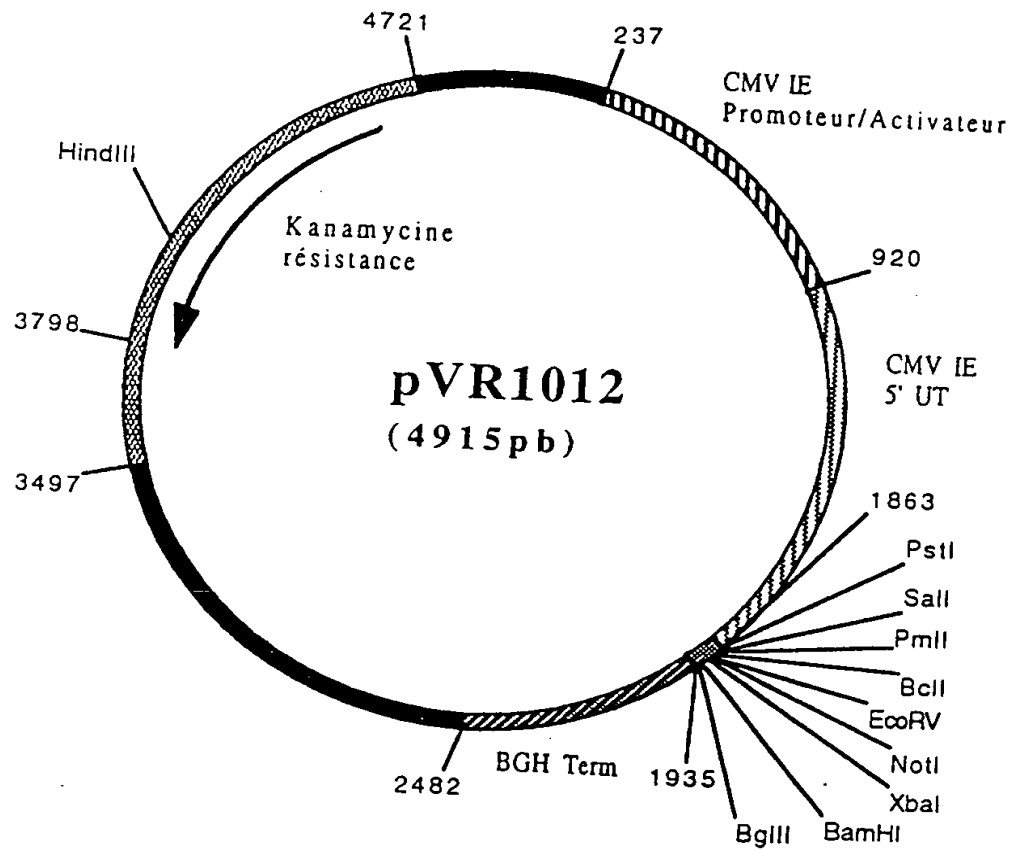


Figure N° 1

THIS PAGE BLANK (USPTO)

2 / 10

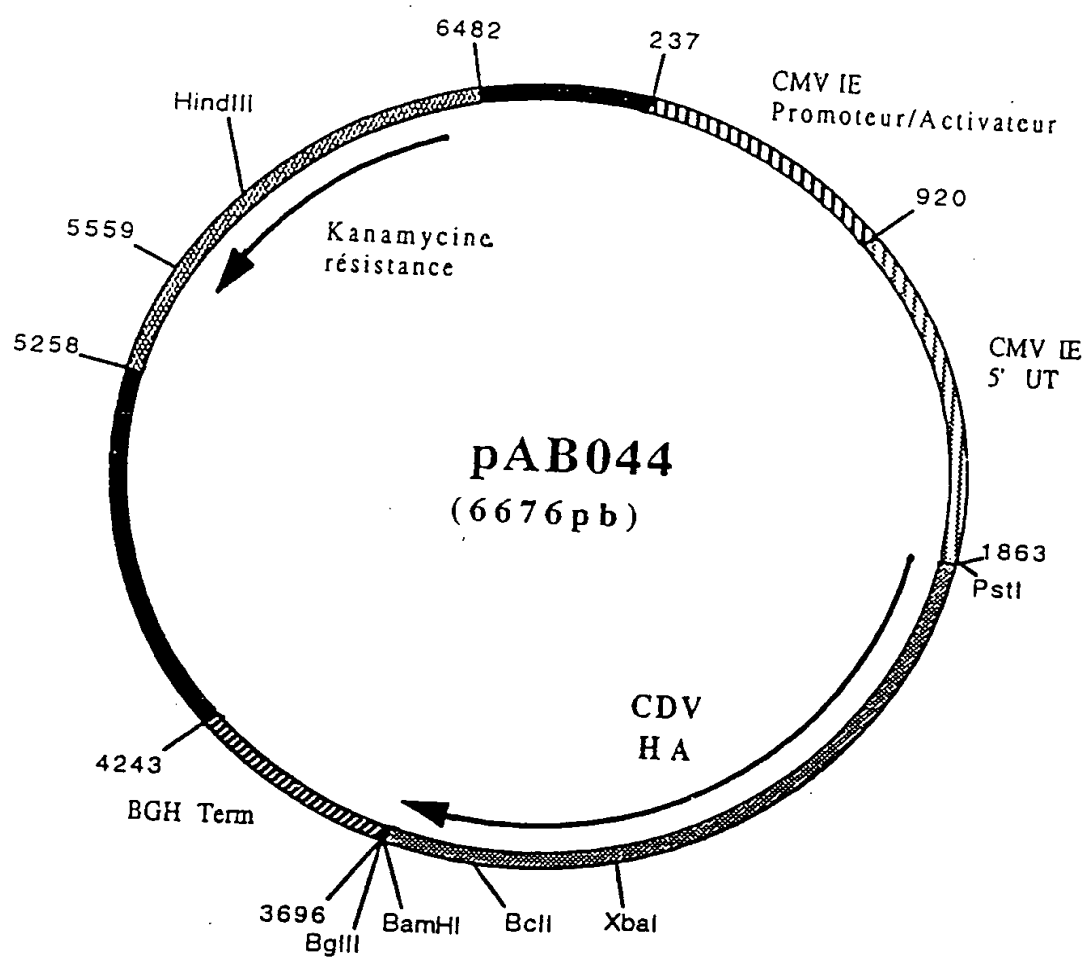


Figure N° 2

THIS PAGE BLANK (USPTO)

3 / 10

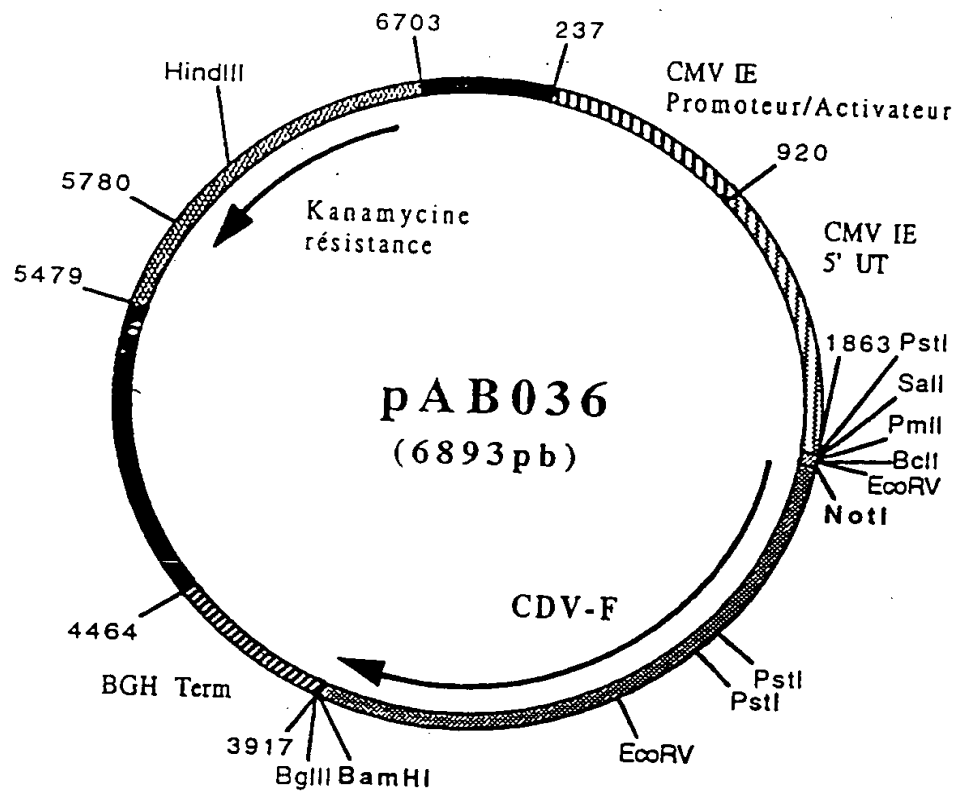


Figure N° 3

THIS PAGE BLANK (USPTO)

4 / 10

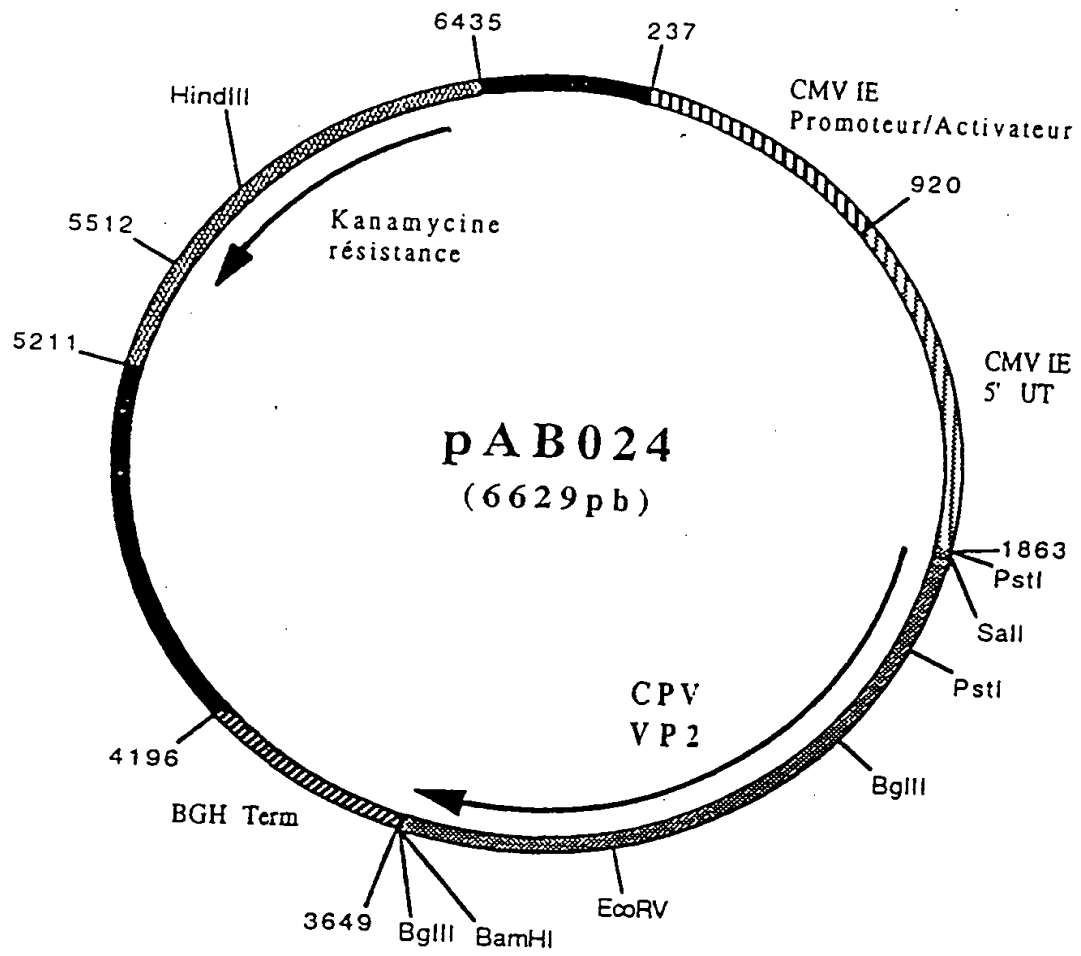


Figure N° 4

THIS PAGE BLANK (USPTO)

5 / 10

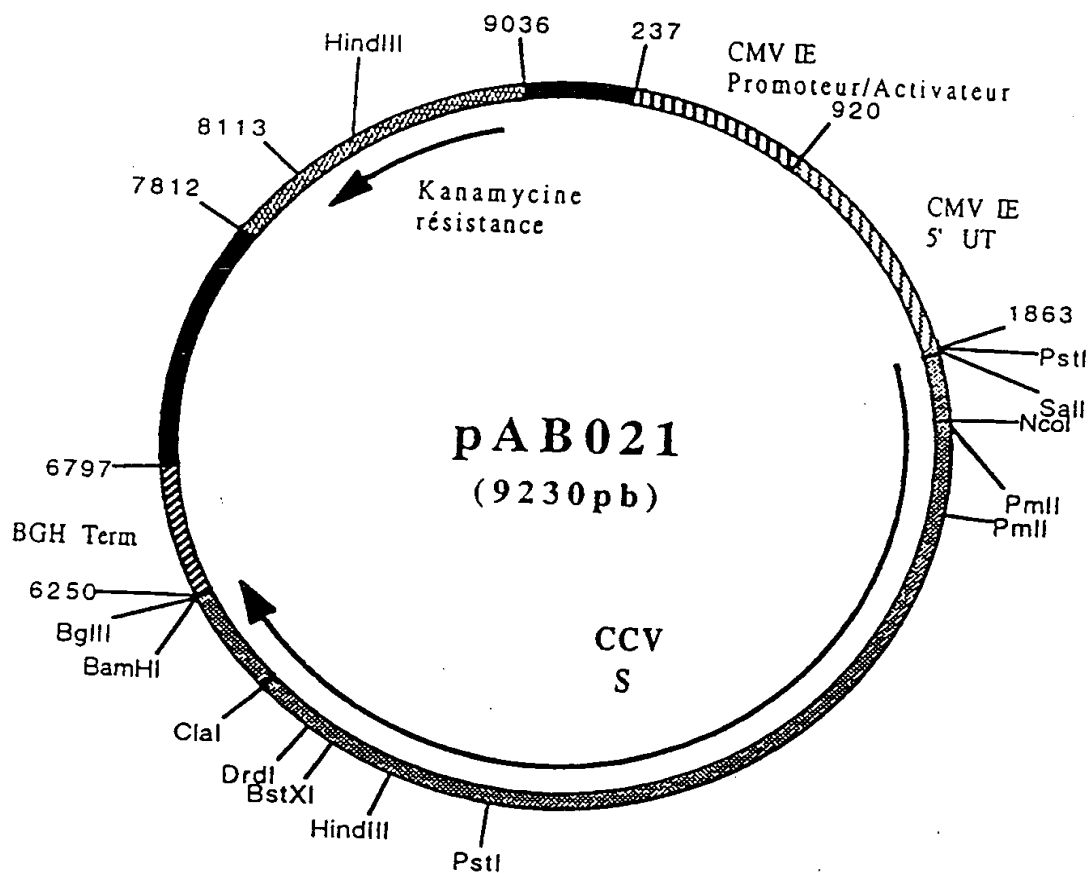


Figure N° 5

THIS PAGE BLANK (USPTO)

6 / 10

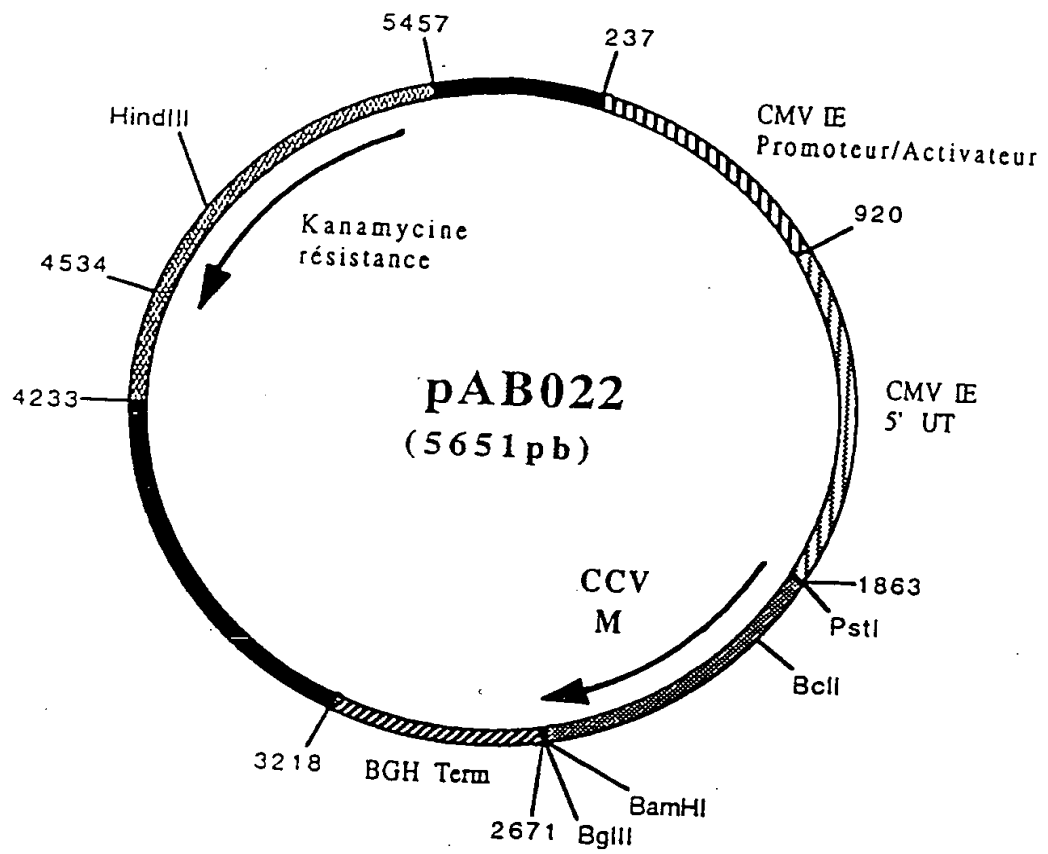


Figure N° 6

THIS PAGE BLANK (USPTO)

7 / 10

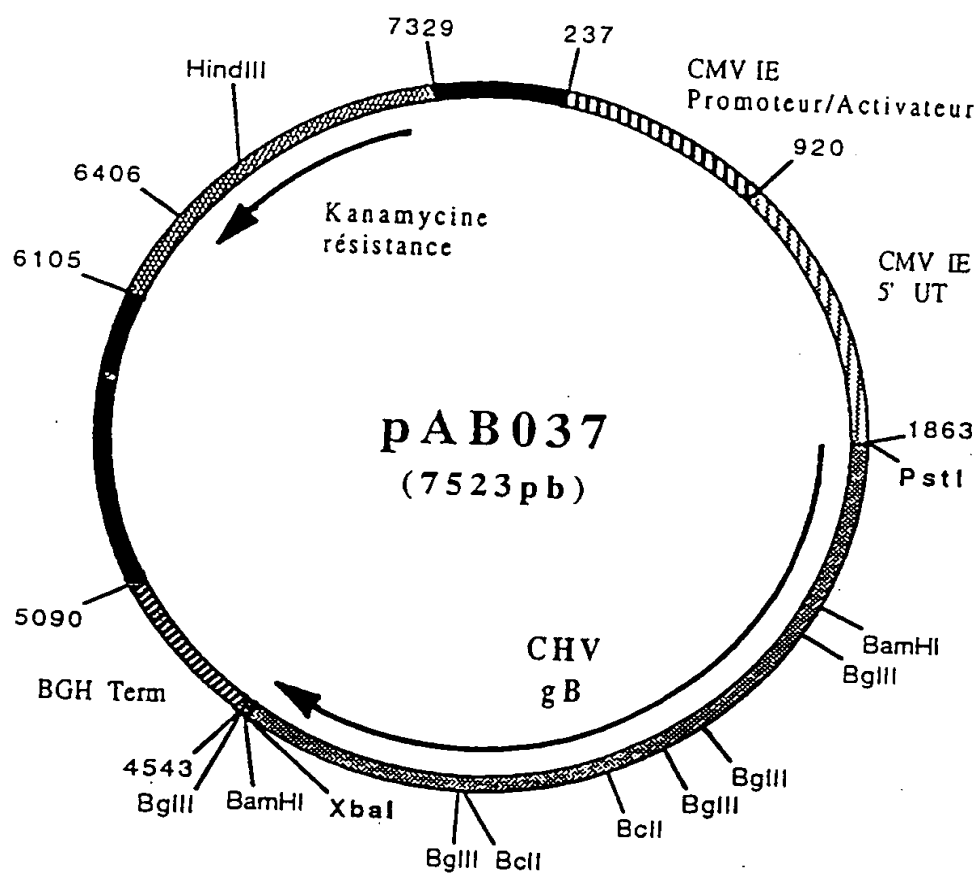


Figure N° 7

THIS PAGE BLANK (USPTO)

8 / 10

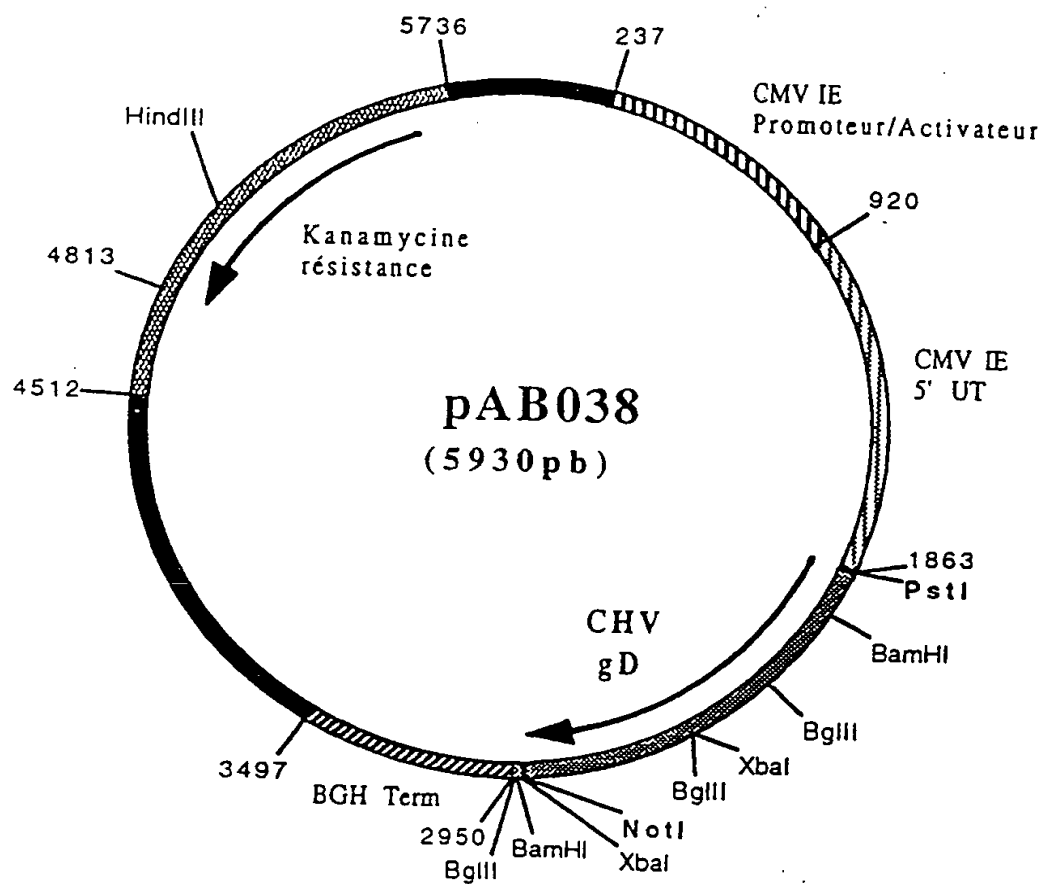


Figure N° 8

THIS PAGE BLANK (USPTO)

9 / 10

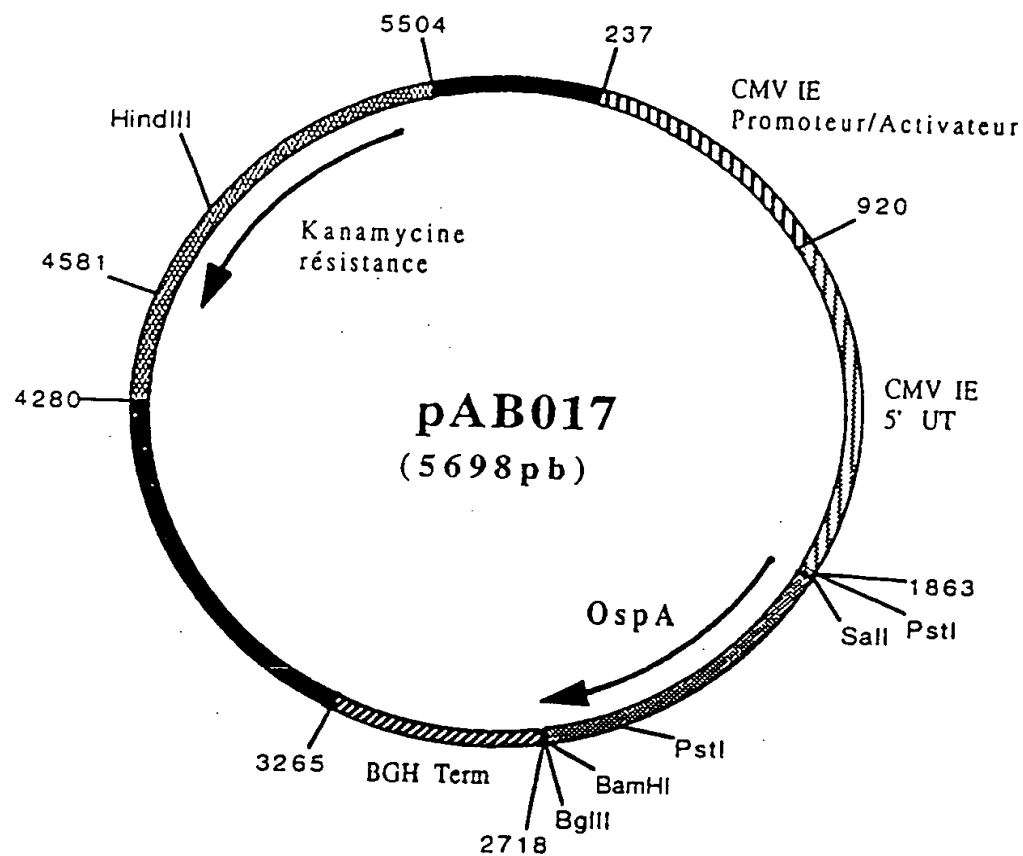


Figure N° 9

THIS PAGE BLANK (USPTO)

10/10

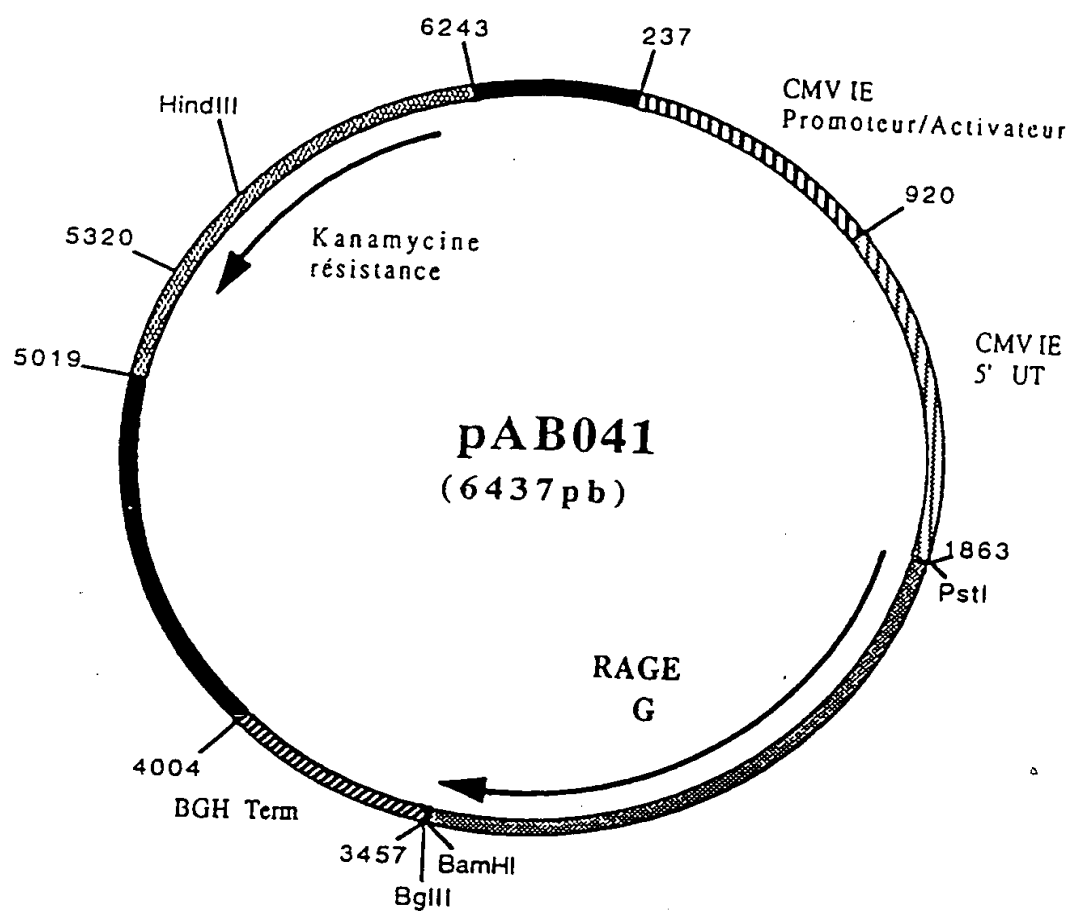


Figure N° 10

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inte: onal Application No

PCT/FR 97/01316

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 A61K39/295 //C12N15/45, C12N15/35, C12N15/50, C12N15/38, C12N15/47

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 A61K C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 95 20660 A (UNIVERSITY OF MASSACHUSETTS MEDICAL CENTER) 3 August 1995 cited in the application see the whole document	1-13
A	FR 2 010 678 A (INSTITUT MÉRIEUX) 20 February 1970 see the whole document	1-13
A	XIANG Z Q ET AL: "Immune response to nucleic acid vaccines to rabies virus." VIROLOGY 209 (2). 1995. 569-579, XP002029171 see the whole document	1-13

☐ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "S" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

21 November 1997

Date of mailing of the international search report

28/11/1997

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040. Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Moreau, J

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 97/01316

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9520660 A	03-08-95	CA 2181832 A	03-08-95
		EP 0740704 A	06-11-96
		US 5620896 A	15-04-97
FR 2010678 A	20-02-70	LU 56248 A	15-01-70

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Den : Internationale No
PCT/FR 97/01316

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 6 A61K39/295 //C12N15/45, C12N15/35, C12N15/50, C12N15/38, C12N15/47

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou a la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
CIB 6 A61K C07K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porte la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	WO 95 20660 A (UNIVERSITY OF MASSACHUSETTS MEDICAL CENTER) 3 août 1995 cité dans la demande voir le document en entier ---	1-13
A	FR 2 010 678 A (INSTITUT MÉRIEUX) 20 février 1970 voir le document en entier ---	1-13
A	XIANG Z Q ET AL: "Immune response to nucleic acid vaccines to rabies virus." VIROLOGY 209 (2). 1995. 569-579, XP002029171 voir le document en entier -----	1-13

☐ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

Catégories spéciales de documents cités:

- *"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- "&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

21 novembre 1997

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

28/11/1997

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Moreau, J

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

De l' e Internationale No

PCT/FR 97/01316

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9520660 A	03-08-95	CA 2181832 A EP 0740704 A US 5620896 A	03-08-95 06-11-96 15-04-97
FR 2010678 A	20-02-70	LU 56248 A	15-01-70